

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003451

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-059551
Filing date: 03 March 2004 (03.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

11.3.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 3日

出願番号
Application Number: 特願2004-059551

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

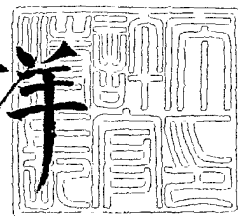
JP2004-059551

出願人
Applicant(s): 独立行政法人農業生物資源研究所
独立行政法人理化学研究所

2005年 4月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 MOA-A0402
【提出日】 平成16年 3月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 【氏名】 賀来 華江
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 【氏名】 渋谷 直人
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 【氏名】 南 栄一
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 【氏名】 南 尚子
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 【氏名】 西澤 洋子
【発明者】
 【住所又は居所】 奈良県奈良市あやめ池南4丁目1-29
 【氏名】 瀧尾 擴士
【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県和光市新倉2934-1-106
 【氏名】 堂前 直
【特許出願人】
 【識別番号】 501167644
 【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所
【特許出願人】
 【識別番号】 503359821
 【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA

(c) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DN

A

(d) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

【請求項 2】

植物がイネである、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされるタンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 5】

請求項 1 もしくは 2 に記載の DNA、または請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 7】

イネ由来である、請求項 6 に記載の形質転換植物体。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項 10】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の DNA、または請求項 4 に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

【請求項 11】

請求項 1 もしくは 2 に記載の DNA、または請求項 4 に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。

【請求項 12】

植物がイネである、請求項 11 に記載の薬剤。

【請求項 13】

病害がいもち病である、請求項 12 に記載の薬剤。

【請求項 14】

請求項 3 に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

【請求項 15】

植物がイネである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

病害がいもち病である、請求項 15 に記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質

【技術分野】

【0001】

本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

エリシターによる植物の生体防御のシグナル伝達過程の分子機構を解明する上で、受容体分子の実体を明らかにすることは最重要課題の一つであるが、植物細胞の膜結合型受容体でリガンドとの対応関係を含めて明らかにされた例は極めて少ない。エリシター受容体に関しては、従来ダイズのグルカン系エリシター結合タンパク質が最も良く検討され、原形質膜のエリシター結合タンパク質をコードすると考えられるcDNAがクローニングされている。しかし、この場合にもこのcDNAから想定されるタンパク質の構造が一般的な受容体様の構造をしていないこともあって、シグナル伝達過程でどのような機能を担っているか、まだ不明の点が多い。最近、分子遺伝学的手法によりフラジェリンエリシター受容体と想定される受容体キナーゼ遺伝子 (FLS2) が単離されているが、この遺伝子産物そのものがエリシターに結合するかどうかは未確定である。その他のものに関しては、結合タンパク質が同定されているものすら限られており、キチン系エリシターに関しては本発明者らの研究以外にはその実体に関する報告は無い。

【0003】

本発明者らは、これまで糸状菌細胞壁の構成多糖であるキチンの特定サイズの断片が、nMオーダーという低濃度でイネ培養細胞のファイトアレキシン合成、膜の脱分極、イオンの流入・流出、タンパク質のリン酸化、活性酸素の生成、ジャスモン酸合成、キチナーゼやPAL (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ) 等の遺伝子発現を引き起こすことを明らかにしてきた (非特許文献1~6参照)。また、このエリシターの脱アセチル体であるキトサンオリゴ糖及び重合度5以下のキチンオリゴ糖では、これらの細胞応答のレベルが低下することも示した。これらの事実は、イネ培養細胞には、キチンオリゴ糖のサイズと構造を厳密に認識する受容体が存在することを示している。本発明者らは、¹²⁵I標識したキチンオリゴ糖を用いた実験から、イネの原形質膜画分に高親和性のエリシター結合タンパク質が存在し、生化学的な解析から、培養細胞に対するエリシター活性とよく対応した結合特異性を持つことも確認している (非特許文献7~9参照)。

【0004】

なお、本願発明に関する先行技術文献を以下に示す。

【非特許文献1】 Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T.: Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 405-409(1993)

【非特許文献2】 Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.-Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y. and Shibuya, N.: Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol.*, 37, 563 (1996)

【非特許文献3】 Kikuyama, M., Kuchitsu, K. and Shibuya, N.: Membrane depolarization induced by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 902-909 (1997)

【非特許文献4】 He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N. and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 11, 1167 (1998)

【非特許文献5】 R. Takai, K. Hasegawa, H. Kaku, N. Shibuya and E. Minami: Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which show

s structural similarity to ATL family from Arabidopsis, in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. Plant Science, 160, 577-583(2001)

【非特許文献 6】 Yamaguchi, T., Minami, E. and Shibuya, N.: Activation of phospholipases by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation, Physiol. Plant., 118, 361-370, (2003)

【非特許文献 7】 Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K., and Maliarik, M.J.: Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. FEBS Lett., 329, 75-78(1993)

【非特許文献 8】 Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y.: Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosaccharide in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. Plant Cell Physiol., 37, 894-898(1996)

【非特許文献 9】 Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N.: Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質、及びその利用方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を、キチンオリゴ糖エリシターへの結合活性を保持したまま、キチンオリゴ糖鎖を固定化したカラムにより精製する方法に関しては、膜タンパク質の可溶化条件の設定、非特異的吸着タンパク質などの混入を防ぐためのプレカラムの工夫、吸着容量・回収率を高めるための親和性担体のデザインと溶出条件の設定などに種々の検討を必要とした。具体的には、Triton X-100 による原形質膜タンパク質の可溶化、APEA誘導体 ((GlcNAc)₈-APEA (aminophenylethylamino)誘導体) を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで、収率良くエリシター結合タンパク質を単離精製した。次いで、N末端アミノ酸配列及び内部鎖アミノ酸配列を解読し、これらのアミノ酸配列情報に基づいて、イネcDNAライブラリーから本発明のタンパク質をコードするcDNAの単離に成功した。

【0007】

本発明のタンパク質は糖タンパク質であり、Con Aレクチンに結合する。そこでCon Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗体を作成し、種々のクロマトグラフィーを工夫し、本目的タンパク質に対する抗体 (抗Con A-CEBiP抗体) を精製した。抗Con A-CEBiP抗体がエリシター応答性活性酸素生成へ与える影響を調べたところ、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本発明のタンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。

【0008】

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔16〕を提供するものである。

〔1〕以下の (a) ～ (d) のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号: 1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号: 1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号: 2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

A

(d) 配列番号: 2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

[2] 植物がイネである、[1] に記載の DNA。

[3] [1] または [2] に記載の DNA によりコードされるタンパク質。

[4] [1] または [2] に記載の DNA を含むベクター。

[5] [1] もしくは [2] に記載の DNA、または [4] に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

[6] [5] に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

[7] イネ由来である、[6] に記載の形質転換植物体。

[8] [6] または [7] に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

[9] [6] ~ [8] のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

[10] [6] ~ [8] のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、[1] もしくは [2] に記載の DNA、または [4] に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

[11] [1] もしくは [2] に記載の DNA、または [4] に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。

[12] 植物がイネである、[11] に記載の薬剤。

[13] 病害がいもち病である、[12] に記載の薬剤。

[14] [3] に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

[15] 植物がイネである、[14] に記載の方法。

[16] 病害がいもち病である、[15] に記載の方法。

【発明の効果】

【0009】

エリシターは、植物において、種々の生体防御関連遺伝子を誘導し、防御反応を引き起こすことが知られている。本発明のタンパク質はエリシターの受容体であると考えられるので、本発明のタンパク質を過剰発現させることで、種々な生体防御応答を誘導できる。よって、本発明のタンパク質を用いることで、新規な、いもち病などの病害防除技術が提供されることが考えられる。また、イネのみでなく多くの植物にも本発明のタンパク質と同様なタンパク質が存在する。本遺伝子情報が明らかになることで、植物が病原菌由来のシグナル分子（エリシター）を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムが明らかになることも期待され、病害に強いイネを含む、多くの作物の育種の開発に寄与することが考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明者らは、植物におけるキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質（CEBiP）を高い収率で単離精製し、該遺伝子配列を解読した。

【0011】

本発明は、以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードする DNA、および、該 DNA によりコードされるタンパク質を提供する。

(a) 配列番号: 1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号: 1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA

(c) 配列番号: 2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

(d) 配列番号: 2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードす

るDNA

【0012】

本発明における上記植物としては、特に限定されず、例えば、穀類、野菜、および果樹等の有用農作物、観葉植物等の鑑賞用植物等が挙げられる。具体的には、該植物として、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ワタ、ニンジン、トマト、ジャガイモ、キク、バラ、カーネーション、シクラメン、シロイヌナズナ等を例示することができる。本発明の上記植物としては、好ましくはイネを挙げることができる。

【0013】

本発明のエリシター結合タンパク質のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、上記cDNAからシグナルペプチドをコードする部分を除いたDNAの塩基配列を配列番号：3、該DNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。本発明のタンパク質は、内部に4種類の配列（配列表の配列番号：4の139番目から152番目までの配列、154番目から161番目までの配列、164番目から176番目までの配列、及び177番目から182番目までの配列）を有する。

【0014】

本発明のDNAは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.) を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部をプローブとして、また配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、他の植物から配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAと高い相同性を有するDNAを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

【0015】

このようなDNAを単離するためには、好ましくは低ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明において低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（穏やかなハイブリダイゼーション条件）とは、5X SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100ug/ml 変性サケ精巢DNA、またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。また、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件、例えば、25% ホルムアミド(V/V)、5X SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100ug/ml 変性サケ精巢DNAの条件下では、より相同性の高いDNAを単離できることが期待される。こうして単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%以上の配列の同一性を指す。

【0016】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2264-2268., Karlin, S. & Altschul, SF., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873.) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, SF. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【0017】

また、本発明は、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似しているタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAも提供する。このようなタンパク質をコードするDNAとしては、該タンパク質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。例えば、本発明のエリシター結合タンパク質のホモログであって、糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))を有し、LysMドメインを有する糖タンパク質をコードするDNAが例示できる。

【0018】

上記のDNAを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記ハイブリダイゼーション技術(Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.)やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350., Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487.)の他に、例えば、該DNAに対し、site-directed mutagenesis法(Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.)により変異を導入する方法が挙げられる。改変されるアミノ酸の数は、改変後のタンパク質が、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似している限り、特に制限はないが、一般的には、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内)である。アミノ酸の改変は、好ましくは保存的置換である。改変前と改変後の各アミノ酸についてのhydropathic index (Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32)やHydrophilicity value (米国特許第4,554,101号)の数値は、±2以内が好ましく、さらに好ましくは±1以内であり、最も好ましくは±0.5以内である。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合(縮重変異)があり、このような縮重変異DNAも本発明に含まれる。

【0019】

本発明のDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、上記の植物のエリシター結合タンパク質をコードする遺伝子を有する植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー(ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる)を作成し、これを展開して、該タンパク質をコードするDNAを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、上記のエリシター結合タンパク質をコードするDNAに特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRを行うことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有する植物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

【0020】

なお、本発明のDNAのうち天然由来のものは、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導される。よって、本発明のDNAの誘導を指標に、被検植物体あるいは被検植物細胞に生体防御機構が作動しているか否かを判定できる。

【0021】

本発明のDNAは、その発現制御により表現型が改変された形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。また、本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製に利用できる。エリシターは植物の生体防御のシグナル伝達過程の分子機構の研究において、重要な物質である。

【0022】

組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のDNAを適当な発現ベクターに

挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England Biolabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A., Journal of Molecular Biology, 1970, 53, 158-162.、Hanahan, D., Journal of Molecular Biology, 1983, 166, 557-580.）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組み換えタンパク質を上記のマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。このようにして作製される本発明のDNAによってコードされるタンパク質もまた、本発明に含まれる。

【0023】

本発明のタンパク質は、植物培養細胞の原形質膜から単離精製することもできる。本発明には、以下の工程によって精製されるタンパク質も含まれる。

- (1) 界面活性剤により原形質膜タンパク質を可溶化する工程
- (2) (1) で得られた可溶化画分中のキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を (GlcNAc)₈-APEA誘導体に結合させる工程
- (3) (2) で結合したタンパク質を溶出させる工程

【0024】

このようなタンパク質は、N末端に配列表の配列番号：4の1番目から32番目までの配列を有し、内部に4種類の配列（配列表の配列番号：4の139番目から152番目までの配列、154番目から161番目までの配列、164番目から176番目までの配列、及び177番目から182番目までの配列）を有する糖タンパク質である。より具体的には、可溶化した原形質膜を、カラム操作においてチューブやカラムのガラス表面に非特異的吸着での損失を防ぐために、あらかじめOVA（卵白アルブミン）を流した3種類のカラムにかける（プレカラム）。1、2本目のカラムはセファロースゲル担体やデキストランに吸着する物質を除去するために用い、3本目のカラムで目的の本発明のタンパク質を吸着する。ただし、プレカラムは上記2本に限定されるわけではない。目的のタンパク質を吸着するためのカラムには、キチンオリゴ糖をそのまま固定化するのではなく、(GlcNAc)₈-APEA(aminophenylethylamino)誘導体を用いることにより吸着容量が大幅に向上したカラムを使用する。次いで、カラムから本発明のタンパク質を溶出させる。目的タンパク質の精製度を上げるために、溶出前に非エリシター糖（結合様式と構造がキチンオリゴ糖に似ているが活性がない糖）でカラムを洗浄してから、目的タンパク質をカラムから溶出させる。上記の単離精製法を用いることで、従来よりも高い精製度で多量のエリシター結合タンパク質を得ることが可能になる。

【0025】

本発明のタンパク質を用いることにより、これに結合する抗体を調製することも可能である。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血ペイを除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得る。

ことにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明には、本発明のタンパク質に結合する抗体が含まれる。また、本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

【0026】

また本発明は、上記DNAまたは核酸を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換植物細胞、該形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、該形質転換植物体の子孫またはクローンである形質転換植物体、および該形質転換植物体の繁殖材料を提供する。本発明の植物体は、本発明のタンパク質を生産するために利用できる。また、該植物体は、いもち病などの病害を防除する機能を有する。

【0027】

本発明のDNAを発現する形質転換植物体を作製する場合には、本発明のDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

【0028】

さらに、本発明は、上記の形質転換植物体の製造方法であって、本発明のDNAまたは核酸、あるいは本発明のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法を提供する。

【0029】

本発明のDNAまたは核酸の植物細胞への導入は、当業者においては、公知の方法、例えばアグロバクテリウム法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、パーティクルガン法により実施することができる。

【0030】

上記アグロバクテリウム法を用いる場合、例えばNagelらの方法（Microbiol. Lett., 1990, 67, 325.）が用いられる。この方法によれば、組み換えベクターをアグロバクテリウム細菌中に形質転換して、次いで形質転換されたアグロバクテリウムを、リーフディスク法等の公知の方法により植物細胞に導入する。上記ベクターは、例えば植物体に導入した後、本発明のDNAが植物体中で発現するように、発現プロモーターを含む。一般に、該プロモーターの下流には本発明のDNAが位置し、さらに該DNAの下流にはターミネーターが位置する。この目的に用いられる組み換えベクターは、植物への導入方法、または植物の種類に応じて、当業者によって適宜選択される。上記プロモーターとして、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35S、トウモロコシのユビキチンプロモーター（特開平2-79983号公報）等を挙げることができる。

【0031】

また、上記ターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、あるいはノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等を例示することができるが、植物体中で機能するプロモーターやターミネーターであれば、これらに限定されない。

【0032】

また、本発明のDNAまたは核酸を導入する植物は、外植片であってもよく、これらの植物から培養細胞を調製し、得られた培養細胞に導入してもよい。本発明の「植物細胞」は、例えば葉、根、茎、花および種子中の胚盤等の植物細胞、カルス、懸濁培養細胞等が挙げられる。

【0033】

また、本発明のDNAまたは核酸の導入により形質転換した植物細胞を効率的に選択するために、上記組み換えベクターは、適当な選抜マーカージ遺伝子を含む、もしくは選抜マーカージ遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入するのが好ましい。この目的に使用する選抜マーカージ遺伝子は、例えば抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、および除草剤ホスフィノスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

【0034】

組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従って適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。

【0035】

次いで、本発明のDNAまたは核酸を導入した形質転換細胞から植物体を再生する。植物体の再生は植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Toki. et al., Plant Physiol, 1995, 100, 1503-1507.)。例えばイネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (インド型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Datta, S K. et al., In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.), 1995, 66-74.)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (日本型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Toki. et al., Plant Physiol, 1992, 100, 1503-1507.)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou, et al., Bio/technology, 1991, 9, 957-962.) およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法 (Hiei. et al., Plant J, 1994, 6, 271-282.) 等、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

【0036】

形質転換細胞から再生させた植物体は、次いで馴化用培地で培養する。その後、馴化した再生植物体を、通常の栽培条件で栽培すると、植物体が得られ、成熟して結実して種子を得ることができる。

【0037】

なお、このように再生され、かつ栽培した形質転換植物体中の導入された外来DNAまたは核酸の存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、または植物体中の核酸の塩基配列を解析することによって確認することができる。この場合、形質転換植物体からのDNAまたは核酸の抽出は、公知のJ. Sambrookらの方法 (Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989) に準じて実施することができる。

【0038】

再生させた植物体中に存在する本発明のDNAよりなる外来遺伝子を、PCR法を用いて解析する場合には、上記のように再生植物体から抽出した核酸を鋳型として増幅反応を行う。また、本発明の核酸がDNAである場合には、該DNAの塩基配列に従って適当に選択された塩基配列をもつ合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、これらを混合させた反応液中において増幅反応を行うこともできる。増幅反応においては、DNAの変性、アニーリング、伸張反応を数十回繰り返すと、本発明のDNA配列を含むDNA断片の増幅生成物を得ることができる。増幅生成物を含む反応液を、例えばアガロース電気泳動にかけると、増幅された各種のDNA断片が分画されて、そのDNA断片が本発明のDNAに対応することを確認することが可能である。

【0039】

一旦、染色体内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料 (例えば種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等) を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。

【0040】

本発明は、植物の病害防除のための薬剤を提供する。本明細書において、植物の病害防除とは、病原菌や害虫などの病原体の侵入に対する植物の自己防御反応を増強させる機能を意味する。具体的には、植物が病害を受けた際に起こす、膜の脱分極、活性酸素の生成、ファイトアレキシン等の抗菌物質の合成等の機能をいう。

【0041】

病害としては、紋枯病、コムギ黒変病、オオムギ斑点病、イネごま葉枯病が挙げられるが、好ましくは、イネいもち病である。

【0042】

本発明の薬剤とは、本発明のDNAまたはベクター自体、または、本発明のDNAまたはベクターを含有する組成物のことである。前記において、「組成物」は種々の物質を含有することができる。そのような物質は、該組成物が本発明の目的を達成することができるものであれば特に限定はないが、例えば、該DNAまたはベクターが安定的に存在するための物質、該DNAまたはベクターの植物細胞内への導入を補助する物質、該DNAやベクターの計量を容易にする増量のための物質等を挙げることができる。

【0043】

本発明はまた、本発明のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法を提供する。タンパク質等を植物体の細胞内で発現させる方法は、上述のとおりである。

【実施例】

【0044】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、実施例は、下記の材料および方法に従って実施した。

1. 培養細胞及び原形質膜の調製

イネ培養細胞(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) はN6培地を改変したL培地(Kuchitsu, K., Kikuyama, M., and Shibuya, N. Protoplasma, 174, 79-81(1993))を用い、インキュベータ中にて25℃、暗所、150 rpmの振盪条件下で行い、振盪培養により継代維持・増殖を行い実験に用いた。

【0045】

イネ培養細胞は2週に1回、滅菌した1 mm角の金網上で裏ごし、細かくした細胞塊を継代にした。なお、各実験においては、この裏ごしすることによる刺激の影響を考慮して、この処理をしてから4日以上経過したものをを用いた。

【0046】

イネ培養細胞から原形質膜の調製は、渋谷らの方法(Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y. Plant Cell Physiol., 37, 894-898(1996))に従って分画遠心分離法により得たミクロソーム画分(microsomal fraction: MF)を、デキストラン/ポリエチレングリコールを用いた水性2層分配法により分画して調製した。得られた原形質膜画分は1~2 mlのPMバッファーに懸濁し、超音波処理で均一にしたのち、-80℃で保存した。

【0047】

2. エリシター糖及びその誘導体

エリシターとして用いたキチンオリゴ糖((GlcNAc)_n)の6量体以下のものは生化学工業株式会社製のfine grade標品を用い、7量体および8量体は焼津水産化学工業より譲渡されたカニ甲殻由来のキトサンオリゴ糖7量体および8量体をそれぞれ再アセチル化することにより調製した。

【0048】

(GlcNAc)₈-APEA誘導体及び(GlcNAc)₈-APEAへの放射性ヨウ素¹²⁵Iの導入は、伊藤らの方法(Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997))に従った。

【0049】

3. アフィニティラベリング

グルタルアルデヒドによるエリシター結合タンパク質アフィニティラベリングは、¹²⁵I-(GlcNAc)₈-APEA誘導体のアミノ基とタンパク質側鎖のアミノ基同士がNaCNBH₃を触媒としてグルタルアルデヒドを介して架橋するものであり、伊藤らの方法(Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997))に従って行った。

【0050】

イネの原形質膜、可溶化原形質膜画分或いは精製したCEBiP画分と100 nM (30 pmol) AP EA誘導体を(液量250 μ l) 水中で1時間反応させ、30 μ gのNaCNBH₃を含む30 μ lの2.5% グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で30分反応させた。反応後、25 μ lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、一晚-80℃にて放置したのち、遠心分離(15,000 rpm、2時間)を行い、沈殿画分をSDS電気泳動に供した。SDS電気泳動は、Multiphor IIマルチパーパス電気泳動装置によるプレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)を用いて、あるいはスラブゲル用電気泳動装置で、ポリアクリルアミド濃度10%, 15%もしくは5-20%のグラジエントゲル(PAGEL、ATTO)で行った。泳動後にゲルを50% メタノール/10% 酢酸水溶液中で30分間固定化処理し風乾したゲル、あるいはゲル内のタンパク質をPVDFメンブレン(Millipore イモビロン-PSQ トランスファーメンブレン)に転写したのち、バイオイメーシングプレートに2~7日間感光させた。プレートをイメージングプレートリーダー及びバイオイメーシングアナライザー(BAS 2000、富士フィルム)で解析し、放射性ラベルされたタンパク質を検出した。

【0051】

(実施例1)キチンエリシター結合タンパク質の精製とアミノ酸配列の解析

CEBiPタンパク質精製に用いたアフィニティーカラムは(GlcNAc)₈-APEA誘導体(75 mg)及びグリシンをそれぞれActivated CH-Sepharose 4Bゲル担体(乾燥ゲル5 g)にファルマシア社付属マニュアルに従って固定化することにより調製した。

【0052】

CEBiPの精製は、以下のように行った。原形質膜画分(20.46 mg)を0.5% Triton X-100を含むTBSバッファー(2mM DTT、1mM PMSF、0.15M NaCl、1mM MgCl₂、25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0))で4℃、1時間反応させた後、卓上超遠心機(4℃、70,000 rpm、1時間)にて得られた上清を可溶化原形質膜画分とした。

【0053】

イネ培養細胞原形質膜からのエリシター結合蛋白質の可溶化には、TritonX-100やn-dodecyl- β -maltoside等の界面活性剤が有効であった。0.5%濃度のTriton X-100により60%の原形質膜タンパク質が可溶化され、¹²⁵Iラベルしたエリシター誘導体との結合実験から、エリシター結合タンパク質の約30%が活性型として回収された。可溶化画分中の結合活性は、原形質膜を用いて得られた結果とよく対応する結合特性を示し、親和性標識の結果からも目的とするエリシター結合タンパク質が活性を保持して可溶化されたことが確認された。

【0054】

この画分を連結した3本のカラム(Aカラム:Sephadex G-75 (15 ml); Bカラム:Glycine-CH-Sepharose 4B (10 ml); Cカラム:(GlcNAc)₈-APEA-CH-Sepharose4B (11 ml))に供した(図1)。微量な精製タンパク質がシリコンチューブやカラムのガラス表面に非特異的吸着で損失することを防ぐために、予め、連結カラム及びチューブ等を1% 卵白アルブミン(OVA)次いで、0.17 M Glycine-HCl bufferで洗浄後、0.005% Triton X-100を含むTBSバッファーで平衡化した。次に、可溶化した原形質膜画分を、セファロースゲル担体やデキストランに吸着する物質を除去するために目的カラム(Cカラム)の前に2本のカラム(Aカラム、Bカラム)を付けた、連結カラムで分画した。Cカラムには高吸着容量の新しい親和性クロマト用担体として(GlcNAc)₈-APEA (aminophenylethylamino)誘導体を用いた。次いで、未吸着物質を除くためカラムをTBSバッファーで洗浄した。目的カラムであるCカラムを、非エリシター糖であるセロヘキサオース及びキトサンヘキサオース混合溶液(1 mg/ml、20 ml)で洗浄後、目的タンパク質を0.17 M Glycine-HCl buffer (pH 2.3)で溶出した。溶出画分は、1 M Tris溶液で直ちに中和し、全量を275 μ lとしたのち、各チューブに25 μ lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、-80℃に一晩放置した。遠心分離により目的タンパク質を回収し、最終容量を80 μ lになるように溶かした。その1 μ lをMultiphor IIマルチパーパス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)で電気泳動後、銀染色を行った。このように、APEA誘導体を用いたカラムと非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせ

ることで収率良く結合タンパク質を単離精製することができた。この方法で精製した画分にはMultiphor II電気泳動装置を用いたSDS電気泳動で75kDa、55kDaの2つのバンドが検出された(図1)。

【0055】

残りの精製タンパク質溶液は、ATTOの15%ポリアクリルアミドSDS電気泳動に供し、PVD F膜に転写、CBB染色後、目的タンパク質のバンドを切り出して、HP241プロテインシーケンサシステム(HEWLETT PACKARD)にてN末端アミノ酸配列の解析を行った。

【0056】

目的タンパク質の内部鎖解析は、以下の方法で行った。ゲルからバンドを切り出し、50 μ lの0.1% SDS、1 mM EDTA、0.1 M Tris-HCl(pH 9.0)に浸漬し、リジンに特異的なプロテアーゼ(リジルエンドペプチダーゼ、Achromobacter protease I)を加え、37℃一晩消化した。消化液をDEAE-5PW(1 x 20 mm; Tosoh, Tokyo)とMightysil RP-18(1 x 50 mm; Kant o Chemical, Tokyo)の連結カラムで分離した。溶媒として、Aには、0.085% TFA aq. Bには、0.075% TFA, 80% CH₃CN. Aqを用い、1-12.5-60%B/1-10-86min. 20 μ l/minで溶出した。溶出ピークは、ペプチドシーケンサー及びMALDI-TOF MSでアミノ酸配列解読及び質量分析を行った。その結果、精製目的タンパク質の32残基のN末端アミノ酸配列と、リジルエンドペプチダーゼ処理により4ヶ所の内部鎖アミノ酸配列が同定された。

【0057】

SDS電気泳動で検出された75kDa、55kDaの2つのバンドはいずれも、¹²⁵I標識した(GlcNAc)₈-APEA誘導体で親和性標識され、N末端アミノ酸配列が同一であった。さらに、リジンを特異的に切断するプロテアーゼによるペプチドマップの解析から、低分子量のバンドは75kDaタンパク質のC末端側が精製中に内在性のプロテアーゼで部分分解されたものと考えられた。

【0058】

上述のように、キチンオリゴ糖をそのまま固定化するのではなく、APEA誘導体として固定化する方法の開発によりカラム担体の吸着容量が大幅に向上し、操作条件全体の検討と併せると初期の方法に比べ20倍近い収率の向上につながった。最終的に設定された条件下では、原形質膜に存在するエリシター結合タンパク質の約1.6%が回収されたものと推定される。この場合には精製過程で人為的にN末端アミノ酸残基を修飾することも無く、また、収率の向上もあって、32残基のN末端アミノ酸配列を解読できた。また、このことにより特定のペプチド分解酵素で特異的に切断されたペプチドを分離・精製し、その解析から4つの内部鎖アミノ酸配列を解読することができた。

【0059】

(実施例2)抗Con A-CEBiP抗体の調製と精製

CEBiPは、コンカナバリンA (Con A) に結合する糖タンパク質である。そこでCon Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗血清を作成し、種々のクロマトグラフィーを工夫し、本目的タンパク質を含む画分に対する抗血清(抗Con A-CEBiP抗体)を精製した。

【0060】

抗Con A-CEBiP抗血清の調製は以下の手順で行った。Con A-Sepharoseカラムを用いて、可溶化したイネ原形質膜画分中のCon Aに結合する全タンパク質を調製した。これを抗原として、ウサギを免疫し、抗Con A-bound fra. 抗血清を得た。

【0061】

この抗血清を以下の方法で精製を行った(図2)。イネ原形質膜画分から(GlcNAc)₇-Lys-Sepharoseを通過した画分及び非エリシター糖(キトサンヘキサオース及びセロヘキサオース)で溶出した画分をそれぞれ固定化したカラムを調製した。抗Con A-bound fra. 抗血清を両カラムで分画し、抗Con A-CEBiP抗体を得た。

【0062】

抗Con A-CEBiP抗体の純度を確かめるために、Con Aカラムに結合したイネ原形質膜画分を¹²⁵Iで標識したエリシター糖でアフィニティーラベルしたのち、2次元電気泳動に展開

後、PVDF膜に転写した。転写膜上で抗Con A-CEBiP抗体を用いてWestern Bolttingを行った。その後、同膜上にある放射性ラベルされたタンパク質を、バイオイメージングアナライザー (BAS 2000、富士フイルム) で解析した。放射能ラベルされたタンパク質とWestern Boltting解析により発色したタンパク質が同一であるかどうかを確かめた。分子量スタンダードには、レインボータンパク質スタンダード (アマシャム社) 及びプレジジョンプロテインスタンダード (BIO-RAD) を用いた。

【0063】

その結果、Western Bolttingで検出された3つのスポットのうち主要な2つは、放射性標識されていた (図3)。このことは、抗Con A-CEBiP抗体が、CEBiPに対して高度に精製されたことを示した。

【0064】

(実施例3) 抗血清による活性酸素生成応答の阻害解析

イネ培養細胞からプロトプラストを調製し、抗ConA-CEBiP抗体のエリシター応答性活性酸素生成への影響を調べた。

【0065】

イネプロトプラストは以下の方法で調整した。

金網で裏ごし4日目のイネ培養細胞を2% Cellulase RS (Yakult) 及び0.05% Pectolyase Y-23を含む0.1% CaCl_2 、0.02% MES、9% Mannitol溶液 (pH 5.6) 14 ml中で、30℃、6時間穏やかに浸とうした。25 μm ナイロンメッシュで細胞を濾過し、メッシュ上の細胞を20 mlのWashing buffer (0.1% CaCl_2 /0.4 M Mannitol) で洗った (Nishimura, N., Tanabe, S., He, D.-Y., Yokota, T., Shibuya, N. and Minami, E. Plant Physiol. Biochem., 39, 1105-1110 (2001))。50 mlのファルコンチューブに集めたプロトプラストを600 rpm、5分間の遠心で回収した。Washing bufferを加え、数回プロトプラストを洗浄したのち、適量のR2P培地に懸濁し、トーマ血球盤でプロトプラスト数を調べた。プロトプラストは、 2×10^6 cells/mlに調整後、25℃、暗所にて一晚保温した。

【0066】

イネプロトプラストにおける活性酸素の生成は、ルミノール法 (Schwacke, R. and Hager, A. Planta, 187, 136-141 (1992)) により行った。反応後の溶液は測定まで氷中に保存した。ルミノール、フェリシアン化カリウムは50 mM カリウムリン酸バッファー pH 7.9を溶媒とした。フェリシアン化カリウムは使用直前に調製し、ルミノール溶液は低温で遮光保存していたものを使用前に室温に戻して用いた。

【0067】

イネプロトプラスト (1×10^6 cells/500 μl) を2 mlチューブに入れ、免疫前 (Preimmune) 抗血清或いは抗Con A-CEBiP抗体で30分間反応させた後、((GlcNAc)₈、100 $\mu\text{g/ml}$) 1 μl あるいはR2P培地を加え15分間ゆっくり攪拌後、1000 rpm、1分間、遠心分離し、上清部を得た。また、同濃度のプロトプラストにR2P培地あるいは(GlcNAc)₈ 1 μl を加えたものをコントロールとした。

【0068】

チューブで反応後の溶液25 μl 、50 mM カリウムリン酸バッファー (pH 7.9) 400 μl 、1.1 mM ルミノール 25 μl 、14 mM フェリシアン化カリウム50 μl を攪拌した後に、すばやくルミノメーター (Turner Design TD-20/20, Sunnyvale CA) にて10秒間化学発光カウントを測定した。 H_2O_2 濃度は、市販 H_2O_2 溶液 (30% H_2O_2 水溶液、和光純薬) による発光を測定し、標準曲線を作成して算出した。

【0069】

プロトプラストにGlcNAcを添加すると、コントロールに比べて活性酸素の生成が1.7倍に増加した。この増加は、免疫前ウサギ血清では、阻害されないが、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することによりほぼ完全に阻害された (図4)。

【0070】

これらの結果は、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシターの受容体タンパク質であることを強く示唆するものであった。

【0071】

(実施例4) イネ cDNA ライブラリー中の CEBiP のスクリーニング

イネ (日本晴) 培養細胞からフェノール・SDS法とオリゴ d T 法で PolyA RNA (mRNA) を単離し、これを鋳型として ZAP-cDNA 合成キット (STRATAGENE) にて イネ 培養細胞 cDNA ライブラリーを調製した。

【0072】

本発明のタンパク質の遺伝子クローニングに関しては、いくつかのアプローチにより検討を行った。N末端アミノ酸15残基の配列に対する抗ペプチド抗体を作製し、抗体を高純度に精製したのち、イネ培養細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングを試みたが、目的タンパク質を含むクローンを単離することが出来なかった。その原因として第一に、15残基のアミノ酸配列情報では特異性が不十分であり、イネ培養細胞中にこの抗体と反応する他のタンパク質が (膜画分以外に) 存在することが考えられる。精製抗ペプチド抗体はミクロゾーム画分及び原形質膜画分を用いる限りでは単一バンドを示す目的タンパク質とのみ反応したが、イネ cDNA ライブラリーをスクリーニングして得た陽性クローンは受容体とは異なる既知のタンパク質と類似した配列を持っていた。このほか、この方法では目的タンパク質が大腸菌中でシグナルペプチドを含んだ形で合成されるため、立体障害の問題からこの抗ペプチド抗体と反応することが困難である可能性も考えられる。

【0073】

このほか、デジェネレーテッドオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、イネ培養細胞 mRNA から作製した環状一本鎖 DNA や、ゲノム DNA を鋳型にして PCR を行う方法も検討したが、多くのバンドが増幅され、サブクローニングが困難であった。また、このオリゴヌクレオチドをプローブとして直接ライブラリーのスクリーニングを行う方法も試みたが、非特異的なスポットが多く見られ、陽性クローンの単離に至らなかった。

【0074】

そこで、本発明者らは、イネ (日本晴) の使用頻度の高いコドンを組み合わせた7残基の N末端アミノ酸配列 (14 KSAILYT/配列番号: 10 (逆向き)) に対応する上流向きプライマーを72種類合成し、イネ培養細胞 cDNA ライブラリーを鋳型とし、それぞれの合成プライマーとベクター上にある既知のプライマーで PCR を行った (図5、6)。合成プライマー (TG TAGAGGATGGCGGACTT/配列番号: 11) とベクターの Reverse primer (GGAAACAGCTA TGACCATG/配列番号: 12) で PCR を行なった結果、目的アミノ酸配列に対応する PCR 増幅産物を得ることに成功した。得られた PCR 断片を TA ベクター (TA cloning kit, Invitrogen) にサブクローニングし、PCR 断片の配列を解読した。このときに得られた PCR 断片の大きさは280bpであり、翻訳されたタンパク質の配列は、シグナルペプチドの前の残基、Tからはじまり49アミノ酸残基であった。

【0075】

目的タンパク質の N末端アミノ酸配列に対応する DNA をプラスミドから切り出し、これをプローブとして、147bp のプローブで イネ 培養細胞 cDNA ライブラリー (4×10^5 pfu) から目的遺伝子をスクリーニングした。

【0076】

その結果、N末端アミノ酸配列が合致する3つの cDNA クローンを単離した。これら3種のクローンは、いずれも目的タンパク質の N末端アミノ酸配列と完全に一致する配列を含んでいた。この mRNA は、28アミノ酸残基のシグナルペプチド (M-28から A-1) 及び C末端側に22アミノ酸残基の推定膜貫通領域 (A307から L328) を含んでいた (図7)。

【0077】

(実施例5) ゲノミックサザンブロット分析

目的遺伝子のコピー数を調べるため、イネから単離したゲノム DNA を各種の制限酵素で処理、アガロースゲルによる電気泳動後、目的タンパク質をコードする DNA をプローブとして、ゲノミックサザンブロット分析を行った。その結果、数種の制限酵素処理したゲノム DNA でシングルバンドが検出され (図8)、目的とするエリシター結合タンパク質遺伝子はシングルコピーであることが示唆された。

【0078】

このことはまた、目的タンパク質をコードするmRNAとN末端配列を共有する低分子量タンパク質をコードするものが、いずれもこの単一遺伝子からスプライシング等の差異によって生成する可能性を示唆している。

【0079】

(実施例6) イネゲノムライブラリー中のCEBiPのスクリーニング

イネゲノムライブラリーをプローブ1 (図7におけるA1からT181のアミノ酸配列部分に対応するDNA断片) でスクリーニングした結果、いくつかの陽性クローンを単離することができた。この中で、もっとも鎖長の長い陽性クローンからDNAを単離し、制限酵素で切断後、それぞれをプラスミドベクターに導入し、全長13,095bpの配列を決定した。この配列中には、目的タンパク質部分が完全にコードされていた。その後、イネゲノムデータベース検索から本発明者らが解析したゲノムDNAを含む遺伝子(AC099399)が見つかり、この遺伝子が第3染色体に座乗していることが確かめられた。このタンパク質の配列とゲノムDNA配列とを照合した結果、この部分のゲノムDNA配列には3箇所のイントロンが存在し(図9)、これらのイントロンのスプライシングによりCEBiPの成熟mRNAが合成されることが明らかとなった。

【0080】

また、この目的遺伝子の発現は、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導されることが確認された(図10)。

【0081】

この目的遺伝子の翻訳産物の解析から、キチンエリシター結合タンパク質はC末端側にアミノ酸22残基からなる膜貫通領域を含むアミノ酸328残基からなり、分子量34640であった。また、11ヶ所の糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))のうち、ペプチドシーケンス解析によりこれまで4ヶ所に糖鎖が付加していることが推測された。また、モチーフ検索から、ペプチドグリカン結合タンパク質に存在するLysMドメインが2ヶ所(図7におけるY85~P131(配列表の配列番号:4の85番目から131番目までの配列)及びY149~P192(配列表の配列番号:4の149番目から192番目までの配列))あることが明らかになった。

【0082】

この目的タンパク質の分子量は、最初に¹²⁵I標識したエリシター糖によるアフィニティータラベルで得られた75kDaのタンパク質と分子量がかけ離れていた。すでに本発明者らは、Multiphor IIマルチパーパス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)を用いた電気泳動では、目的タンパク質が7万5千に検出されるが、一方、ATTOのスラブ電気泳動装置を用いたものでは、6万5千から6万7千に検出されることを報告している(Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001))。これまで使用していたレインボータンパク質スタンダードは非常にブロードであり、より正確なりコンビナントタンパク質で調製された分子量スタンダードを使用すると、これまで65kDaから67kDaであった目的タンパク質は、分子量56kDaであった。さらに、より正確なCEBiPの分子量を測定するために、MALDI TO F-MS(Bruker ReFlex)を用いた。その結果、主として、40kDa及び35kDaの2つのピークを得た(図11)。これらの分子量の差は、CEBiPへの付加糖鎖の差によるものと考えられた。

。

【0083】

(実施例7) TFMS処理によるCEBiP糖鎖の除去

遺伝子から算出される分子量と、電気泳動により推定した分子量の差は、糖鎖付加によるものかどうかを確かめるために、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)によりイネ原形質膜タンパク質中の糖タンパク質の糖鎖を化学的に切断し、SDS-PAGEに続いてWestern Blottingを行ったのち、抗CEBiP抗血清による目的タンパク質の検出を行った。

【0084】

抗CEBiP抗血清は以下の方法で作製した。

まず、大腸菌大量発現系においてCEBiPを発現させた。具体的には、目的タンパク質か

ら膜貫通領域を除いた領域に対応するcDNA断片をPCRで調製し、それをポリヒスチジン標識ベクターであるpET16bに挿入したのち、配列を確認した。該cDNA断片の塩基配列を配列番号: 7に、cDNAをコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 8に示す。これを大腸菌BL21に導入し、200 μ g/mlのカルベニシリンを含むLB培地中で37℃にて4時間半培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、同濃度のカルベニシリンを含むLB培地1mlに再懸濁させた後、50 μ lをカルベニシリン（最終濃度 500 μ g/ml）を含む8mlのLB培地に添加し3時間培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、カルベニシリン（最終濃度 500 μ g/ml）を含む8mlのLB培地に再懸濁させ、IPTG（最終濃度 1 mM）を加え、30℃、2時間培養を行ったのち、遠心分離（10000rpm、20℃）で菌体を回収し、-80℃にて保存した。

【0085】

次に、CEBiPを発現する菌体をPBSに懸濁したのち、ソニックで破碎し、遠心分離により沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動を行った。発現タンパク質を含むゲルバンドを切り出し、PBSを加え、乳鉢で粉碎後、4℃で一晩攪拌し、目的タンパク質を抽出した。これを抗原として、ウサギに免疫を行い、抗CEBiP抗血清を得た。

【0086】

TFMS処理および目的タンパク質の検出は以下の方法で行なった。

イネ原形質膜画分(20 μ g)をねじ口瓶に入れ、十分に乾燥させたのち、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)50 μ lに溶解させ、0℃、1時間静置した。反応液に氷冷した1 M Tris を500 μ l加え中和したのち、チューブに275 μ lずつ分注し、27.5 μ lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、-80℃で、一晩放置後、遠心分離して、沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動、Western Blottingに供し、抗CEBiP抗血清で目的タンパク質の検出を行った。

【0087】

その結果、33kDa付近に陽性バンドが認められた(図12)。この分子量は、遺伝子から算出される値とよく一致していた。

【0088】

岡田らは、イネの葉や根の原形質膜にCEBiPと同一と考えられる結合タンパク質を見いだした(Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001))。キチンオリゴ糖がリグニン化を誘導することが報告されているコムギの葉から得た原形質膜においても同様のキチンオリゴ糖結合タンパク質が見いだされたが分子サイズは若干異なっていた。種々の植物の培養細胞を調べた結果、オオムギ、ニンジンなどの培養細胞の原形質膜に同様の結合タンパク質が見いだされた(Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., and Shibuya, N., Plant Cell Physiol., 43, 505-512 (2002))。これらのことは、こうしたキチン系エリシター認識系がイネに特有のものではなく、多くの植物に存在する進化的に保存されたものであることを示唆している。

【0089】

本遺伝子情報が明らかになることは、植物が病原菌由来のシグナル分子（エリシター）を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムを明らかにすることが期待され、病害に強い作物の育種や新規な病害防除技術の開発に寄与することが考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】 イネ培養細胞からのキチンエリシター結合タンパク質の精製を示す図及び写真である。

【図2】 抗Con A-CEBiP抗体の精製方法を示す図である。

【図3】 アフィニティーラベルしたCon Aに結合するイネ原形質膜画分を2次元SDS-PAGEの結果を示す写真である。

【図4】 活性酸素生成における抗CEBiP抗体又は抗血清の効果を示すグラフである。

【図5】 ペプチドシーケンサーから得たN末端32残基アミノ酸配列を示す図である。

【図6】 オリゴキチン結合タンパク質のクローニングの概略図である。

【図 7】 イネ由来キチンエリシター結合タンパク質のcDNAを示す図である。図中の塩基配列を配列番号：5、アミノ酸配列を配列番号：6に示す。

【図 8】 ゲノミックサザンブロット分析の結果を示す写真である。

【図 9】 キチンエリシター結合タンパク質の配列とゲノムDNAの配列の照合結果を示す図である。

【図 10】 可溶化培養細胞における(GlcNAc)₇のCEBiPの発現への影響を示す写真である。

【図 11】 MALDI TOF-MS によるCEBiPの分子量の測定結果を示す図である。

【図 12】 TFMSによるCEBiPの糖鎖除去を示す写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences
RIKEN

<120> N-Acetylchitooligosaccharide elicitor binding protein

<130> MOA-A0402

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1071

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

<223>

<400> 1

atg	gcg	tcg	ctc	acc	gcc	gcc	ctg	gcc	acg	ccg	gcg	gcc	gct	gcc	ctc	48
Met	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	
1				5				10					15			

ctc	ctc	ctc	gtc	ctc	ctc	gcc	gcc	ccc	gcc	tcc	gcc	gcc	aac	ttc	acc	96
Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Ala	Asn	Phe	Thr	
			20					25					30			

tgc	gcg	gtg	gct	tca	ggc	acc	acc	tgc	aag	tcc	gcc	atc	ctc	tac	acc	144
Cys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Lys	Ser	Ala	Ile	Leu	Tyr	Thr	
		35					40					45				

tcc	ccc	aac	gcc	acc	acc	tac	ggc	aac	ctc	gtc	gcc	cgc	ttc	aac	acc	192
Ser	Pro	Asn	Ala	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Arg	Phe	Asn	Thr	
		50					55				60					

acc	acc	ctc	ccc	gac	ctc	ctc	ggc	gcc	aac	ggc	ctc	ccc	gac	ggc	acg	240
Thr	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	
		65				70				75				80		

ctt	tcc	tcc	gcc	ccc	gtc	gcc	gcc	aat	tcc	acc	gtc	aaa	atc	ccc	ttc	288
Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Ala	Ala	Asn	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Pro	Phe	
			85					90						95		

cgc	tgc	cgc	tgc	aac	ggc	gac	gtc	ggc	cag	tcg	gac	cgc	ctc	ccc	atc	336
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile	
100 105 110	
tac gtc gtg cag ccg cag gac ggg ctc gac gcc atc gcg cgc aac gtg	384
Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val	
115 120 125	
ttc aac gcc ttc gtc acc tac cag gag atc gcc gcc gcg aac aac atc	432
Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Ala Asn Asn Ile	
130 135 140	
ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg tgg att ccg ctg	480
Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu	
145 150 155 160	
ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg atg cac ctc gcc	528
Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala	
165 170 175	
tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcg atc gct gcc aag tac	576
Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr	
180 185 190	
ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag atc gac gac ccc	624
Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro	
195 200 205	
acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg ctc cct gtg tgc	672
Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys	
210 215 220	
cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat ctg atg ctc ctc	720
Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu	
225 230 235 240	
ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc atc cgc tgc agc	768
Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser	
245 250 255	
tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca gta cag aac aag	816
Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys	
260 265 270	
gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg aag ctt ggt gag	864
Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu	
275 280 285	
acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc tac agt ggt tac	912
Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr	
290 295 300	

tcc aac agt tca tgc ctc atc ata caa acc agc ctt gca act aat cag 960
 Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln
 305 310 315 320

aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg cag ttc gct agg 1008
 Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gln Phe Ala Arg
 325 330 335

tcc atg tgg agc atg tct gtt atc tcc ttc cac atg gtg ttg atc att 1056
 Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met Val Leu Ile Ile
 340 345 350

atc tgt ttc ctt tga 1071
 Ile Cys Phe Leu
 355

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 2
 Met Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Leu Leu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Asn Phe Thr
 20 25 30

Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala Ile Leu Tyr Thr
 35 40 45

Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala Arg Phe Asn Thr
 50 55 60

Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu Pro Asp Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val Lys Ile Pro Phe
 85 90 95

Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile
 100 105 110

Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val
 115 120 125

Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Ala Asn Asn Ile
 130 135 140

Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala
 165 170 175

Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr
 180 185 190

Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro
 195 200 205

Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys
 210 215 220

Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu
 225 230 235 240

Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser
 245 250 255

Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys
 260 265 270

Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu
 275 280 285

Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr
 290 295 300

Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln
 305 310 315 320

Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gln Phe Ala Arg
 325 330 335

Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met Val Leu Ile Ile
 340 345 350

Ile Cys Phe Leu
 355

<210> 3
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(987)
 <223>

<400> 3

gcc aac ttc acc tgc gcg gtg gct tca ggc acc acc tgc aag tcc gcc 48
 Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
 1 5 10 15

atc ctc tac acc tcc ccc aac gcc acc acc tac ggc aac ctc gtc gcc 96
 Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala
 20 25 30

cgc ttc aac acc acc acc ctc ccc gac ctc ctc ggc gcc aac ggc ctc 144
 Arg Phe Asn Thr Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu
 35 40 45

ccc gac ggc acg ctt tcc tcc gcc ccc gtc gcc gcc aat tcc acc gtc 192
 Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val
 50 55 60

aaa atc ccc ttc cgc tgc gcg tgc aac ggc gac gtc ggc cag tcg gac 240
 Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp
 65 70 75 80

cgc ctc ccc atc tac gtc gtg cag ccg cag gac ggg ctc gac gcc atc 288
 Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile
 85 90 95

gcg gcg aac gtg ttc aac gcc ttc gtc acc tac cag gag atc gcc gcc 336
 Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala
 100 105 110

gcg aac aac atc ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg 384
 Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu
 115 120 125

tgg att ccg ctg ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg 432
 Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val
 130 135 140

atg cac ctc gcc tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcg atc 480
 Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile
 145 150 155 160

gct gcc aag tac ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag 528
 Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys
 165 170 175

atc gac gac ccc acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg 576

Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
 180 185 190

ctc cct gtg tgc cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat 624
 Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
 195 200 205

ctg atg ctc ctc ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc 672
 Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys
 210 215 220

atc cgc tgc agc tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca 720
 Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240

gta cag aac aag gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg 768
 Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255

aag ctt ggt gag acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc 816
 Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270

tac agt ggt tac tcc aac agt tca tcg ctc atc ata caa acc agc ctt 864
 Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285

gca act aat cag aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg 912
 Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

cag ttc gct agg tcc atg tgg agc atg tct gtt atc tcc ttc cac atg 960
 Gln Phe Ala Arg Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met
 305 310 315 320

gtg ttg atc att atc tgt ttc ctt tga 987
 Val Leu Ile Ile Ile Cys Phe Leu
 325

<210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 4
 Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala

20	25	30
Arg Phe Asn Thr Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu		
35	40	45
Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val		
50	55	60
Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp		
65	70	75
Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile		
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala		
100	105	110
Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu		
115	120	125
Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val		
130	135	140
Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile		
145	150	155
Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys		
165	170	175
Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro		
180	185	190
Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn		
195	200	205
Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys		
210	215	220
Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala		
225	230	235
Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu		
245	250	255
Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala		
260	265	270
Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu		
275	280	285

Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

Gln Phe Ala Arg Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met
 305 310 315 320

Val Leu Ile Ile Ile Cys Phe Leu
 325

<210> 5
 <211> 1612
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 5
 ttccatcggg aattttgaaa tttcagtgat tttttgttct ccaagtctga ctcaaacc aa 60
 tcaattccac acaagttcac cattttctac tttgatgcaa tcgaaccaa ggatagggaa 120
 agggccacgc tgcaaccatt taagtcgcca caagcactag catcgaggca tactcctcct 180
 gttccagtgt caacacgaca gtcaaacaaa caccaagcct ctcatccca cctctcgagg 240
 agagctttcc ccaccatggc gtcgctcacc gccgccctgg ccacgccggc ggccgctgcc 300
 ctctctctcc tcgtctcctc cgccgcccc gcctccgccg ccaacttcac ctgcgcggtg 360
 gcttcaggca ccacctgcaa gtccgccatc ctctacacct cccccaacgc caccacctac 420
 ggcaacctcg tcgcccgtt caacaccacc accctccccg acctcctcgg cgccaacggc 480
 ctccccgacg gcacgtttc ctccgcccc gtcgccgcca attccaccgt caaatcccc 540
 ttccgctgcc gctgcaacgg cgacgtcggc cagtcggacc gcctcccat ctacgtcgtg 600
 cagccgcagg acgggctcga cgccatcgcg cgcaacgtgt tcaacgcctt cgtcacctac 660
 caggagatcg ccgccgcgaa caacatcccc gacccaaca agataaatgt cagccagacg 720
 ctgtggattc cgctgccctg cagctgcgac aaggaggaag gctctaactg gatgcacctc 780
 gcctacagcg tcggcaaagg ggagaacacg tcggcgatcg ctgccaagta cggggtgacg 840
 gagtccacgc ttctcaccag aaataagatc gacgaccca cgaaattgca gatgggacag 900
 attctagatg tcccgtccc tgtgtgccgt tcatcaatca gcgatacctc agctgatcac 960
 aatctgatgc tctcccgga tggcacctat ggattaccg caggaaactg catccgctgc 1020

agctgcagtt caactaccta ccagctaaac tgcactgcag tacagaacaa gggatgcccg 1080
 tcagtgccac tgtgcaatgg aacgctgaag cttggtgaga cgaacggcac cggttgcgga 1140
 tcaacaacgt gcgcctacag tggttactcc aacagttcat cgctcatcat acaaaccagc 1200
 cttgcaacta atcagacaac agcctgccag agaggaggat ctgggaggtc gcagttcgt 1260
 aggtccatgt ggagcatgtc tgttatctcc ttccacatgg tgttgatcat tatctgtttc 1320
 ctttgatggt ggagactact gcaactctag atggtacatt tcaaagagtt ctctacgac 1380
 tatgattggt gtatacgata tatgattggt gtcgtaactt agattttgat gactgggtta 1440
 tccagctttg aaatttgagt ttgactctg ttctttagag gatgagtggc acttgtagcg 1500
 ctgcttgaat aaaacgtcga tgtattgtat tcgatctgca tctgaaaagg aatattcatt 1560
 agataggatt attcgaata aaaagatccc acatgttttt gttaaaaaaa aa 1612

<210> 6
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 6
 Asn Phe Ser Asp Phe Leu Phe Ser Lys Ser Asp Ser Asn Gln Ser Ile
 1 5 10 15
 Pro His Lys Phe Thr Ile Phe Tyr Phe Asp Ala Ile Glu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Arg Glu Arg Pro Thr Leu Gln Pro Phe Lys Ser Pro Gln Ala Leu Ala
 35 40 45
 Ser Arg His Thr Pro Pro Ala Pro Val Ser Thr Arg Gln Ser Asn Lys
 50 55 60
 His Gln Ala Ser His Ser His Leu Ser Arg Arg Ala Phe Pro Thr Met
 65 70 75 80
 Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Leu Leu
 85 90 95
 Leu Leu Val Leu Leu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Asn Phe Thr Cys
 100 105 110
 Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala Ile Leu Tyr Thr Ser
 115 120 125

Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala Arg Phe Asn Thr Thr
130 135 140

Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu Pro Asp Gly Thr Leu
145 150 155 160

Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val Lys Ile Pro Phe Arg
165 170 175

Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile Tyr
180 185 190

Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val Phe
195 200 205

Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Ala Asn Asn Ile Pro
210 215 220

Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu Pro
225 230 235 240

Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala Tyr
245 250 255

Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr Gly
260 265 270

Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro Thr
275 280 285

Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys Arg
290 295 300

Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu Pro
305 310 315 320

Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser Cys
325 330 335

Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys Gly
340 345 350

Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu Thr
355 360 365

Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr Ser
370 375 380

Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln Thr

385 390 395 400
 Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gln Phe Ala Arg Ser
 405 410 415
 Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met Val Leu Ile Ile Ile
 420 425 430
 Cys Phe Leu
 435

<210> 7
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(918)
 <223>

<400> 7
 gcc aac ttc acc tgc gcg gtg gct tca ggc acc acc tgc aag tcc gcc 48
 Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
 1 5 10 15
 atc ctc tac acc tcc ccc aac gcc acc acc tac ggc aac ctc gtc gcc 96
 Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala
 20 25 30
 cgc ttc aac acc acc acc ctc ccc gac ctc ctc ggc gcc aac ggc ctc 144
 Arg Phe Asn Thr Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu
 35 40 45
 ccc gac ggc acg ctt tcc tcc gcc ccc gtc gcc gcc aat tcc acc gtc 192
 Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val
 50 55 60
 aaa atc ccc ttc cgc tgc cgc tgc aac ggc gac gtc ggc cag tcg gac 240
 Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp
 65 70 75 80
 cgc ctc ccc atc tac gtc gtg cag ccg cag gac ggg ctc gac gcc atc 288
 Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile
 85 90 95
 gcg cgc aac gtg ttc aac gcc ttc gtc acc tac cag gag atc gcc gcc 336
 Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala
 100 105 110

gcg aac aac atc ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg 384
 Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu
 115 120 125

tgg att ccg ctg ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg 432
 Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val
 130 135 140

atg cac ctc gcc tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcg atc 480
 Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile
 145 150 155 160

gct gcc aag tac ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag 528
 Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys
 165 170 175

atc gac gac ccc acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg 576
 Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
 180 185 190

ctc cct gtg tgc cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat 624
 Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
 195 200 205

ctg atg ctc ctc ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc 672
 Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys
 210 215 220

atc cgc tgc agc tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca 720
 Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240

gta cag aac aag gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg 768
 Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255

aag ctt ggt gag acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc 816
 Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270

tac agt ggt tac tcc aac agt tca tcg ctc atc ata caa acc agc ctt 864
 Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285

gca act aat cag aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg 912
 Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

cag ttc 918

Gln Phe
305

<210> 8
<211> 306
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 8
Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala
20 25 30

Arg Phe Asn Thr Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu
35 40 45

Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val
50 55 60

Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp
65 70 75 80

Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala
100 105 110

Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu
115 120 125

Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val
130 135 140

Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile
145 150 155 160

Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys
165 170 175

Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
180 185 190

Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
195 200 205

Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys

210 215 220
 Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240
 Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255
 Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270
 Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285
 Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300
 Gln Phe
 305

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<400> 9
 Ala Xaa Phe Thr Xaa Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Xaa Lys Ser Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Val Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Xaa Val Ala
20 25 30

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 10
Thr Tyr Leu Ile Ala Ser Lys
1 5

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

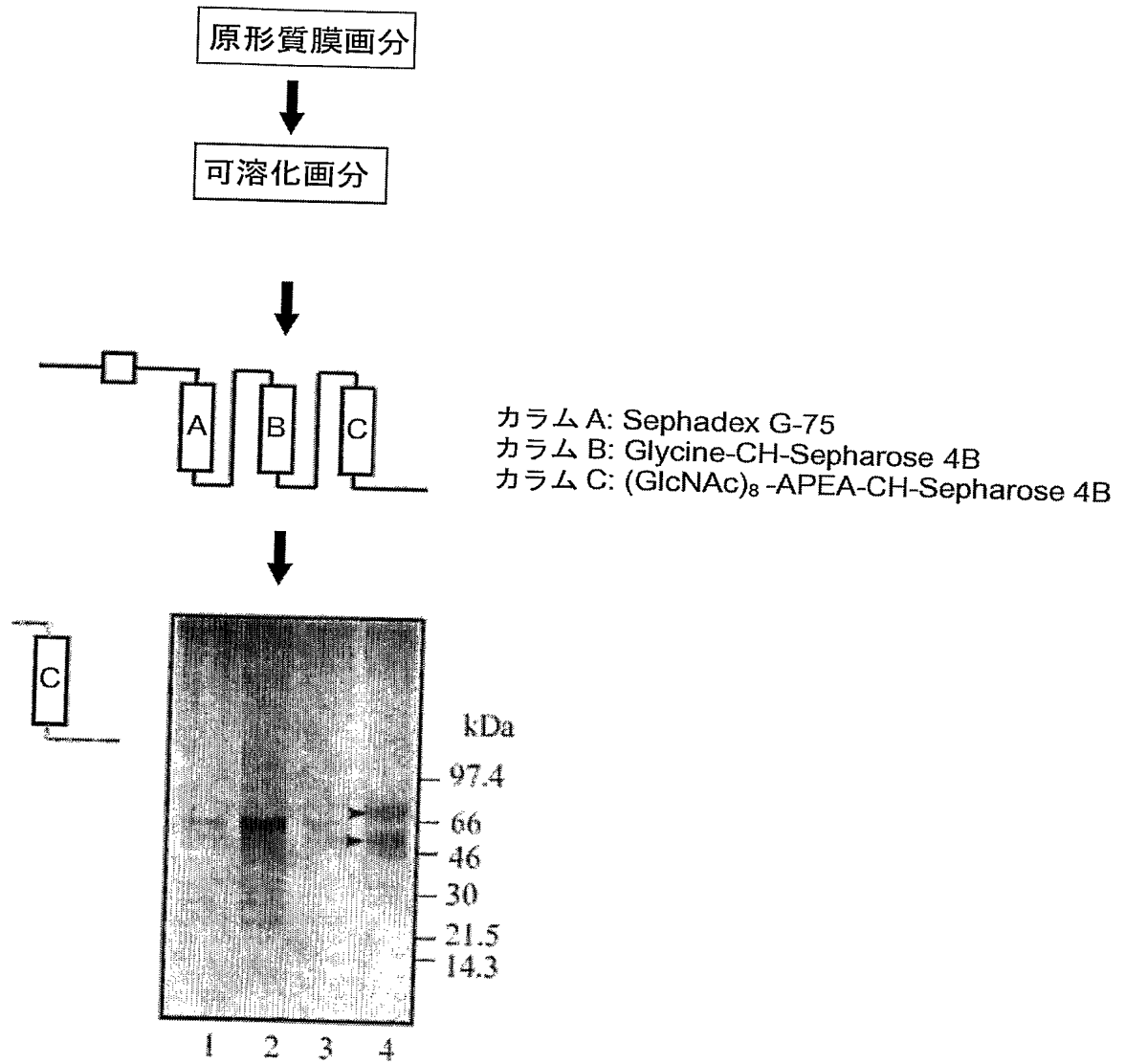
<400> 11
tgtagaggat ggcggactt 19

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

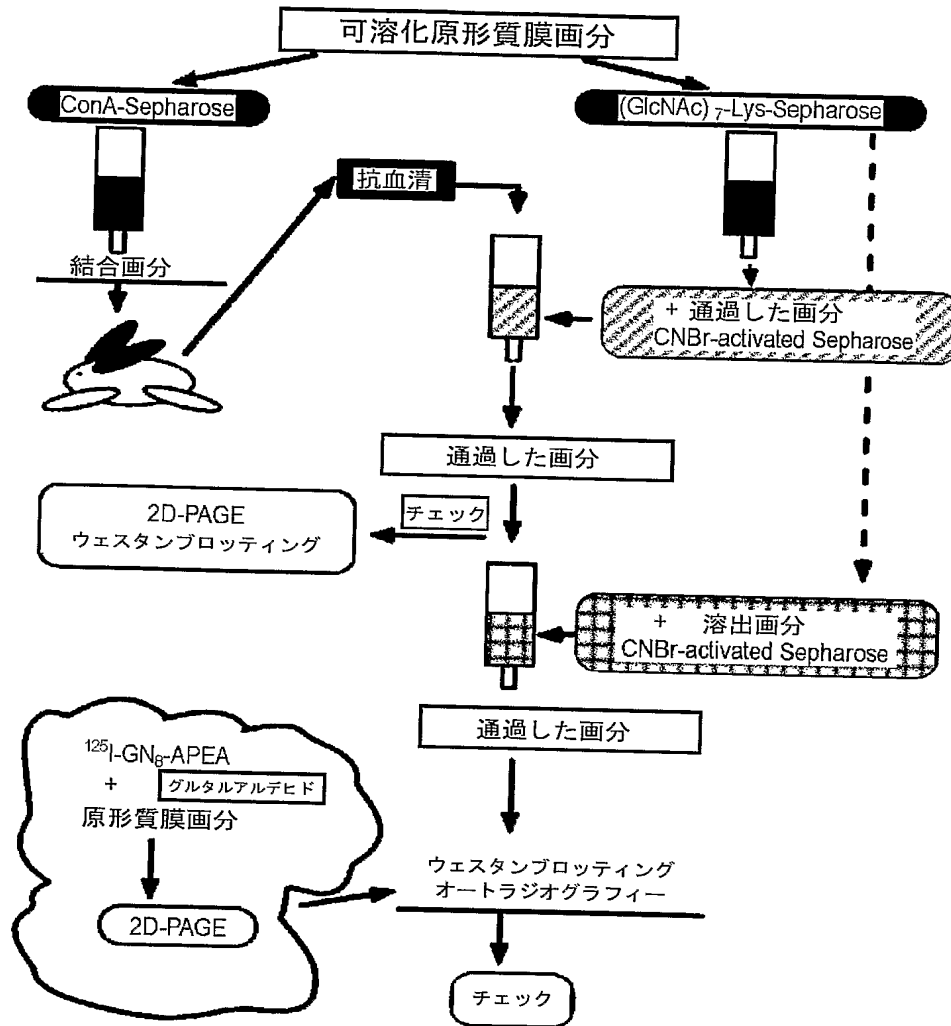
<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 12
ggaaacagct atgaccatg 19

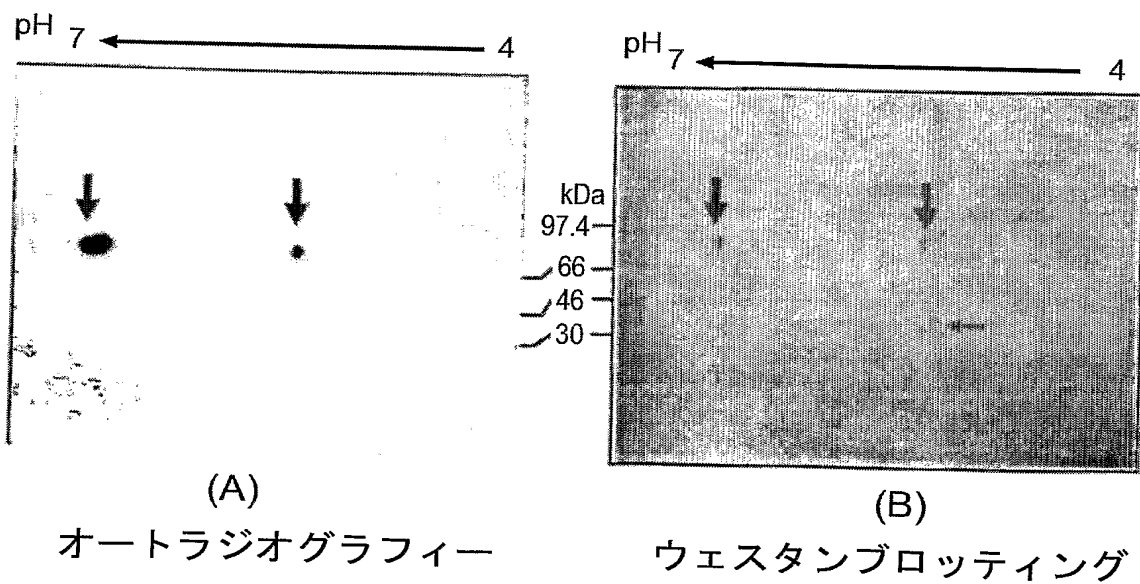
【書類名】 図面
【図 1】



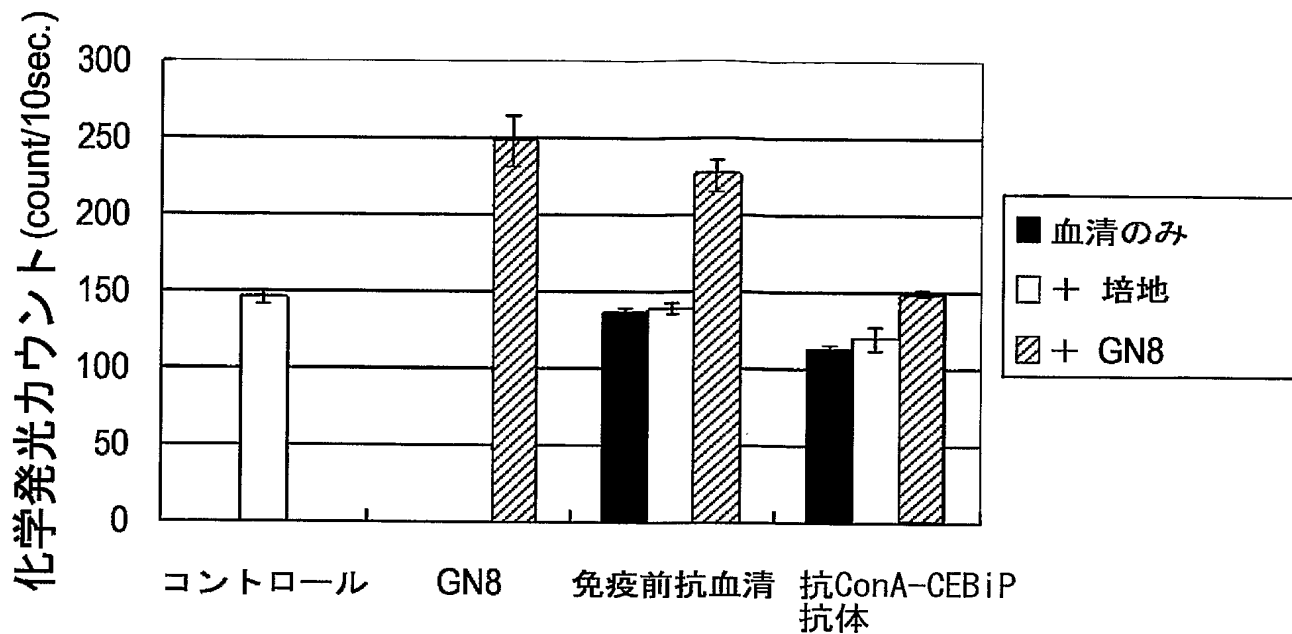
【図2】



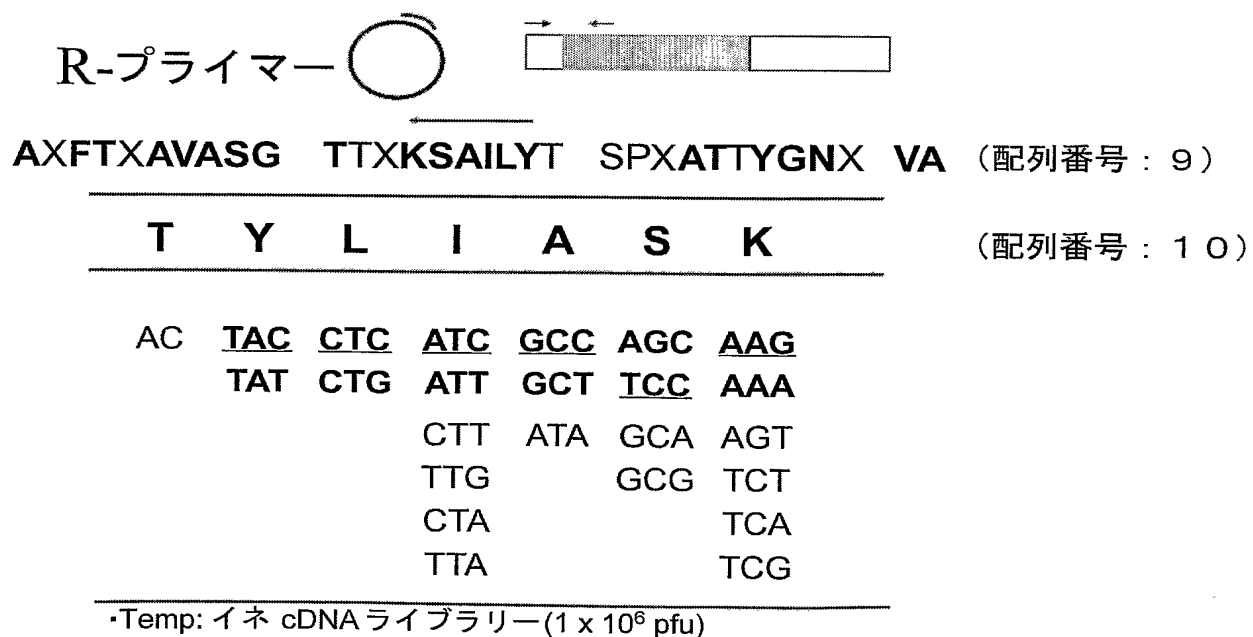
【図3】



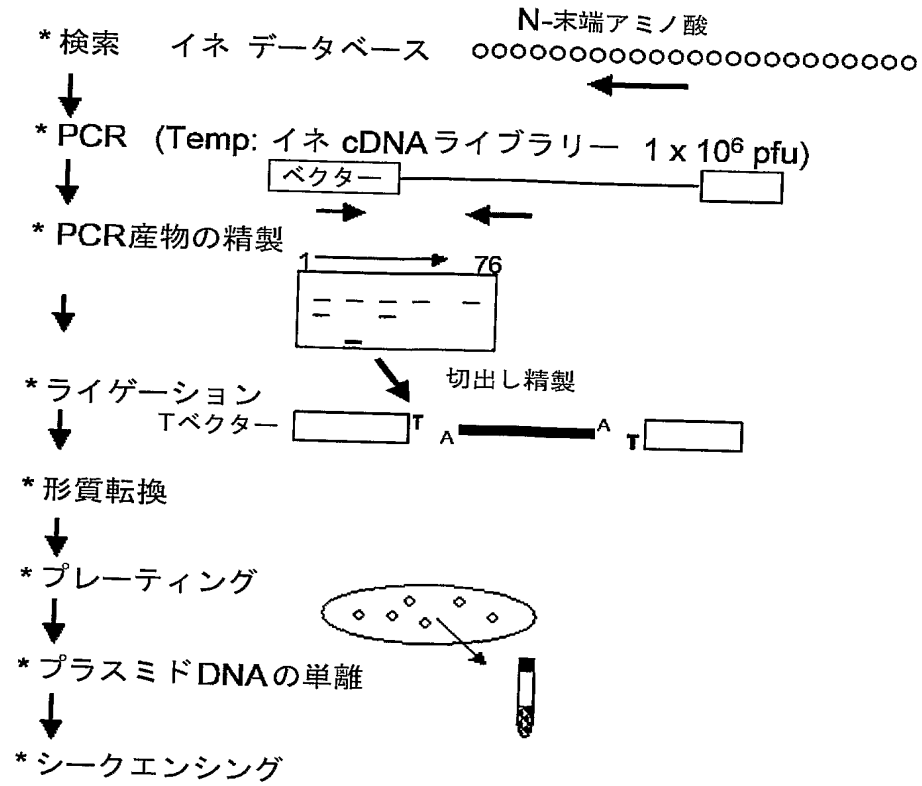
【図 4】



【図 5】



【図 6】

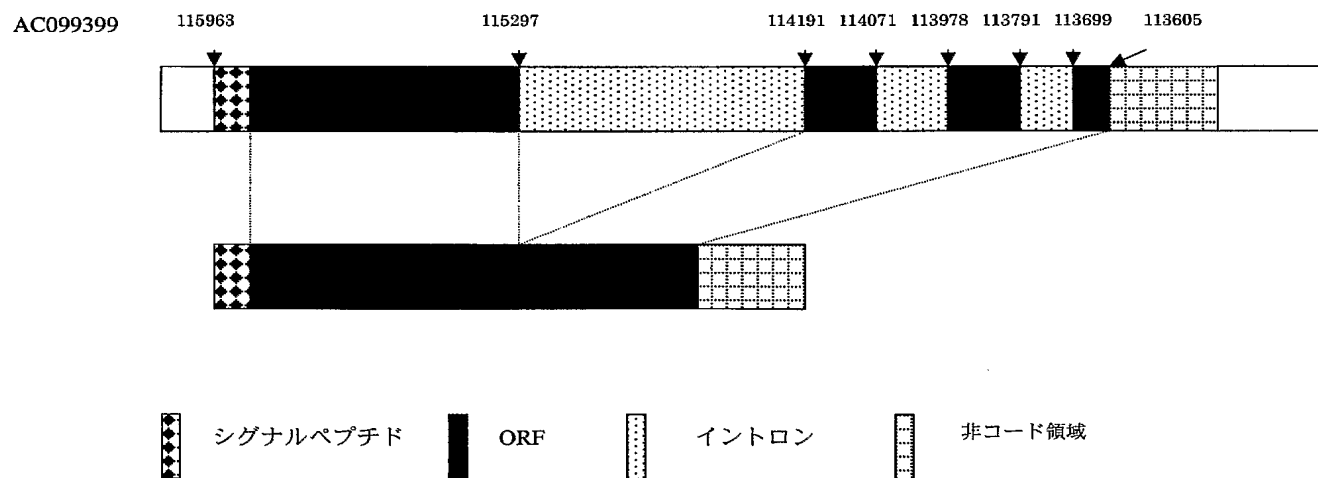


【図 8】

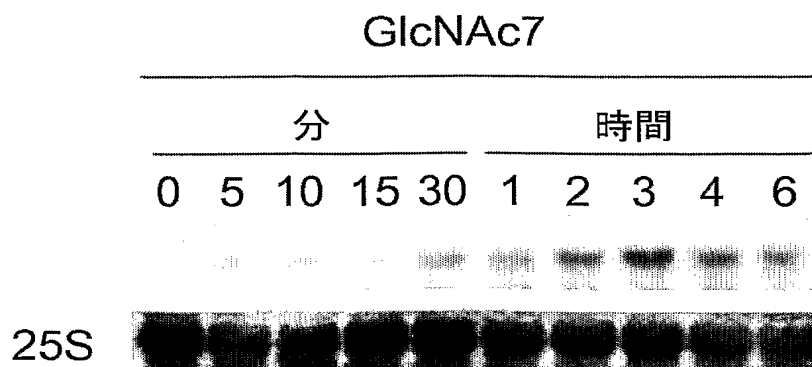
Hind III *Bam* H I
Not I *Xba* I *Eco* R I



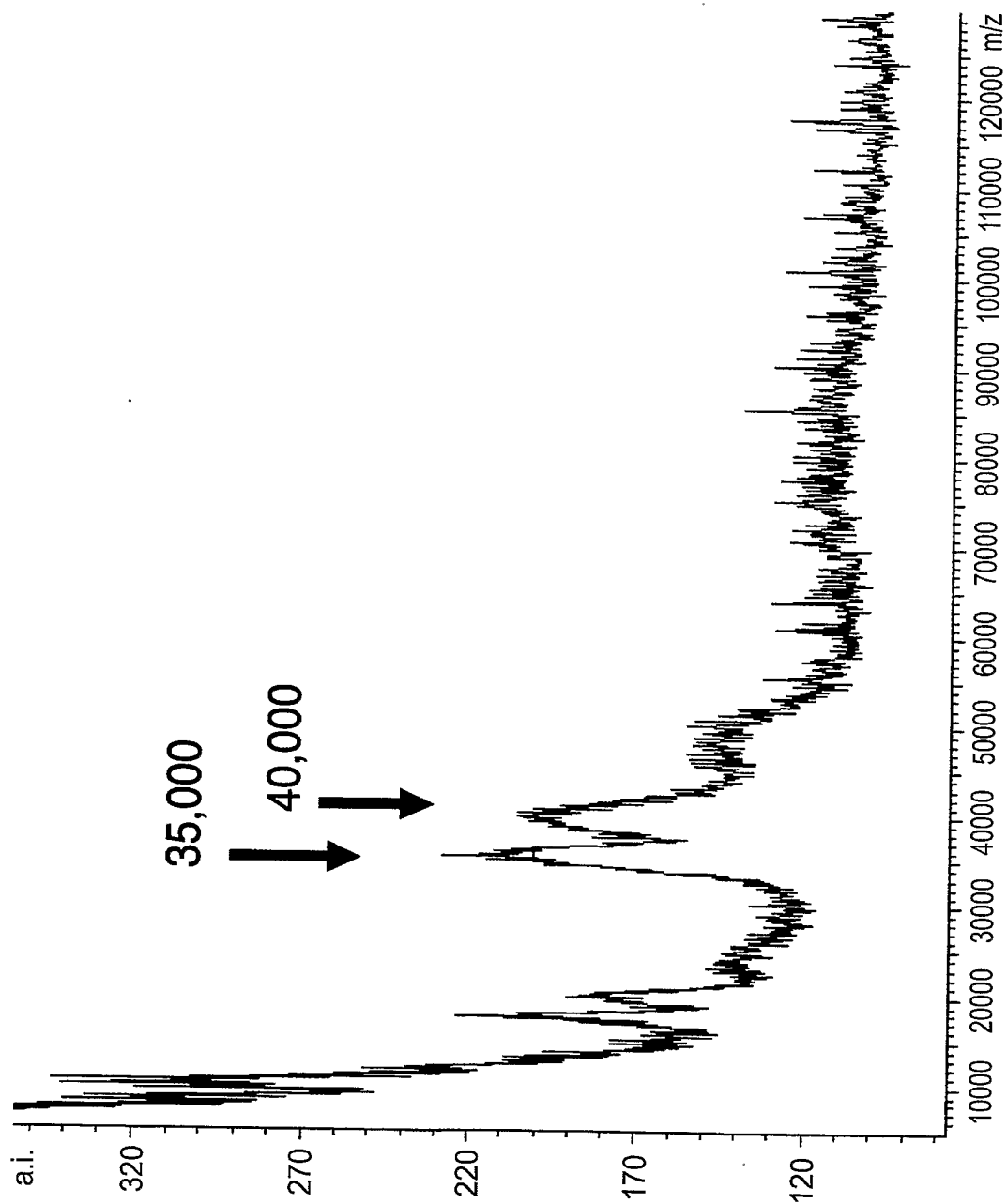
【図 9】



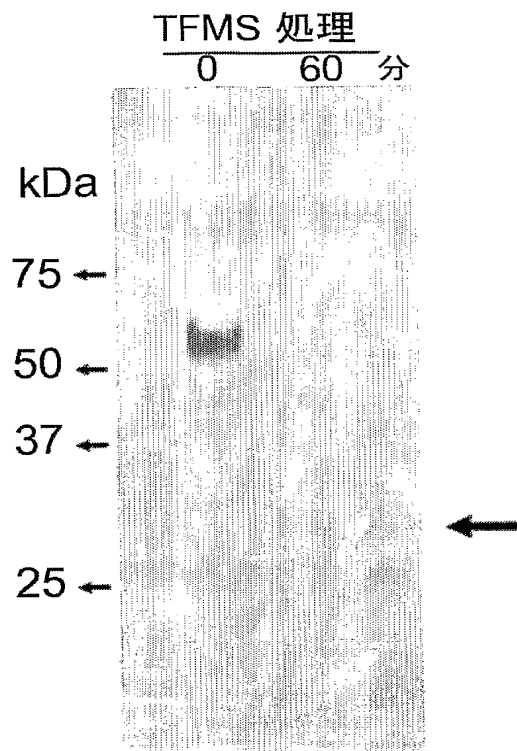
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質を同定することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、APEA誘導体を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで収率良くエリシター結合タンパク質を単離精製した。これにより得られたN末端、及び内部鎖アミノ酸配列を利用して、イネcDNAライブラリーから本発明のタンパク質をコードするcDNAの単離に成功した。また、抗Con A-CEBiP抗体を精製し、エリシター応答性活性酸素生成に与える影響を調べたところ、該抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。該エリシターは、イネにいもち抵抗性を誘導するので、本発明のタンパク質は、新規な病害防除技術の開発に応用できる。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 5 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 1 6 7 6 4 4]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 4 月 2 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2
氏 名	独立行政法人農業生物資源研究所

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 5 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 5 9 8 2 1]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏 名	独立行政法人理化学研究所